

Lektor- og adjunktprogrammet ved Universitetet i Oslo

**Hunnenes partnervalg basert på
visuelle stimuli hos trepigget
stingsild (*Gasterosteus aculeatus*)**

Evelyn Kamilla Kristensen

Master i realfagsutdanning, 2008

30 studiepoeng



Biologisk institutt

CEES

**Centre for Ecological and Evolutionary
Synthesis**

Forord

Dette studiet ble gjennomført ved Universitetet i Oslo, som en del av et prosjekt ved CEES: *Adaptive trait transitions and speciation in sticklebacks (Gasterosteus aculeatus L.)*.

Jeg vil aller først takke veileder Asbjørn Vøllestad for verdifull veiledning og gode råd vedrørende gjennomføring av forsøk, skriving av oppgaven og statistikk. Siden jeg er student ved Lektor- og adjunktprogrammet har jeg ingen statistikk fra tidligere, men takket være Asbjørn ble det litt statistikk i oppgaven min. Jeg vil også takke han for å være tålmodig, og at han alltid tok seg tid til å svare på mine mange spørsmål.

Jeg vil også rette en takk til veileder Kjartan Østbye, uten hans kreativitet ville forsøkene blitt vanskelig å gjennomføre. Jeg må også takke han for at han alltid tok seg tid til mine utallige spørsmål og frustrasjon, og hans gode veiledning gjennom hele prosessen.

En takk blir også rettet til Helene Lampe for gode råd rundt bruk av EthoVision, Kjell Døving for lån av utstyr, Sarah Östlund-Nilsson for gode råd, guttene ved IT-avdelingen for teknisk hjelp og Inger Maren Rivrud for å være en reddende ”word”-engel.

Et stort hurra og takk fortjener også mine medstudenter, jeg vil spesielt trekke fram den fantastiske lesesalen på rom 4419 (”Næsje et al.”), med dens innbyggere: Oda Bjærke (som fortjener en ekstra takk for all hjelp), Kim Magnus Bærum, Maria Aasen, Gaute Thomassen, Eirik Krogstad, Annette Taugbøl og Truls Næsje. Jeg vil også takke Vegard Vikshåland Kne for gode råd om akvariestell og Marthe Bråthen Lund for støtte, latter og utløp for frustrasjon. Jeg vil også nevne bio-gjengen generelt, en mer fantastisk gjeng skal man lete lenge etter!

Familien min fortjener også en takk. Takk til min bror, Roar Andreas Kristensen, for gjennomlesing av oppgaven og gode råd, takk til min kjære mamma, Anne Lully Strand, som har fått meg på riktig spor når jeg har vært fortvilet og takk til pappa, Jan Erik Kristensen, for gode telefonsamtaler.

Til slutt vil jeg takke den viktigste personen i livet mitt, min forlovede Lars Ragnar Skutlaberg. Takk for at du alltid stiller opp, for at du lyser opp hverdagen min og for at du oppmuntrer meg. Tusen takk for at du ble med på denne berg- og dalbane turen, nå gleder jeg meg til å gå av på trygg jord, og gå inn i neste fase sammen med deg.

*Evelyn K. Kristensen,
Universitetet i Oslo, 2. juni 2008.*

Sammendrag

Marine trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) har kolonisert ulike ferskvannshabitat gjentatte ganger og denne koloniseringen har ført til ulikheter innen trekk som morfologi, atferd, fysiologi og livshistorie. Disse adaptive endringene har i noen tilfeller ført til artsdannelse, noe som gjør trepigget stingsild til en god modellorganisme for å undersøke de ulike mekanismene bak artsdannelse. Dette studiet har undersøkt partnervalg blant hunner fra tre ulike morfer av trepigget stingsild, lavplate-, intermediær- og fullplatemorf. Studiet har undersøkt om det er tegn til pre-zygotiske barrierer mellom de tre morfene i form av selektiv partnervalg (av hanner med samme morf) hos hunnene. Fisken brukt i forsøk var fra Sandvikselven (lavplatemorf) og Engervannet (intermediær- og fullplatemorf), og kun modne individer ble benyttet (hann: rød hake og blå øyne, hunn: synlig egg i buken). Hunnene fikk kun benyttet seg av synet for å gjøre sitt partnervalg.

Et forsøk inneholdt tre hunner og tre hanner, henholdsvis en representant for hver morf, der hunnene fikk valget mellom de tre hannene. Forsøksoppsettet hadde et hunnakvarium i midten, og seks hannakvarier rundt, og ved hjelp av et videoanalyseprogram, EthoVision, ble hunnakvariet delt inn i seks ulike soner som ble tilegnet tilstøtende akvarium. Det var tre interessesoner (en for hver hann som deltok i forsøk) og tre kontrollsoner. Ved hjelp av EthoVision ble prosentvis tid hunnen brukte i hver sone og svømmehastigheten estimert. Rødfargeintensiteten til de ulike hannene ble målt og beregnet slik at man fikk en gjennomsnittlig rødfargeindeks for de ulike morfene.

Hunnene i forsøkene gjorde ingen signifikante partnervalg, verken med hensyn til morf eller rødfargeintensitet. Hunnene oppholdt seg signifikant mer i interessesonene enn kontrollsonene. Den eneste forskjellen som ble funnet mellom morfene var at lavplatehunner svømmer signifikant raskere enn intermediær- og fullplatehunner, de var også gjennomsnittlig større og det ble funnet en positiv korrelasjon mellom lengde og svømmehastighet.

Siden hunnene kun benyttet synet i disse forsøkene, har man utelukket en rekke stimuli som sannsynligvis må til for at hunnen kan gjøre et klart partnervalg. Flere studier må til for å kartlegge en eventuell pre-zygotisk barriere mellom disse morfene.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	1
Sammendrag.....	2
1 Introduksjon	4
2 Materialer og metoder	7
2.1 Fangstområder og fisk	7
2.2 Forsøksoppsett.....	11
2.3 Forsøk.....	12
2.4 Kvantifisering av data.....	14
2.5 Fargeestimering	17
3 Resultater	19
3.1 Beskrivelse av fisken.....	19
3.2 Kvalitative observasjoner	21
3.3 Kvantitative observasjoner	22
4 Diskusjon.....	24
4.1 Visuelle stimuli som kan påvirke partnervalg	24
4.1.1 Morf	24
4.1.2 Størrelse	25
4.1.3 Farge	26
4.1.4 Atferd.....	26
4.2 Partnervalg ved andre stimuli.....	27
4.3 Hunnenes atferd.....	27
4.4 Eksperimentelt design	28
4.3 Bruk av EthoVision for å kartlegge partnervalg.....	30
5 Konklusjon.....	31
Referanser	32
Appendiks	36

1 Introduksjon

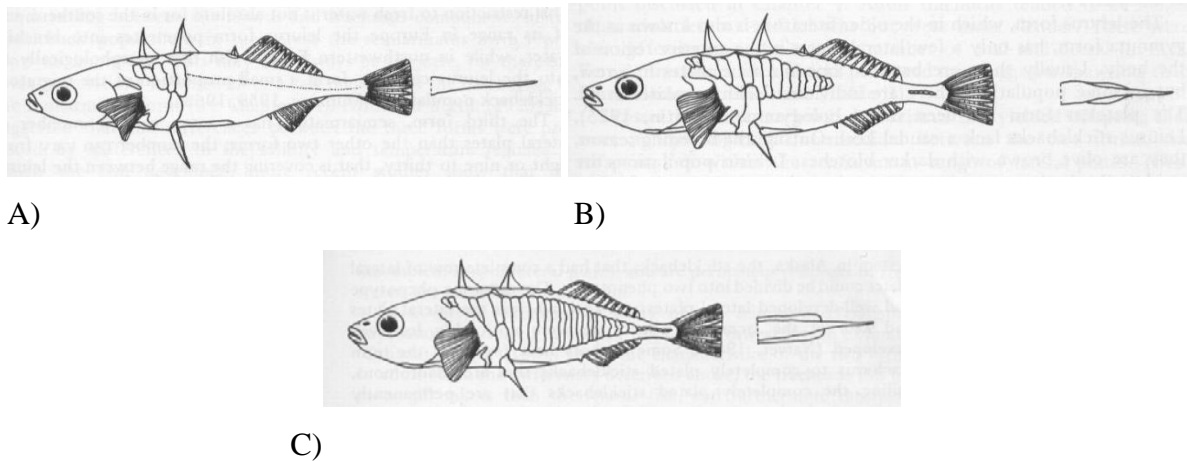
Det biologiske artsbegrepet definerer en art som en gruppe individer som kan reproducere seg og få fertile avkom (Oxford dictionary of biology 2004). En ny art kan formes enten sympatrisk (uten geografisk atskillelse fra opprinnelig art), parapatrisk (atskilt, men genflyt forekommer) eller allopatrisk (geografisk isolasjon). Isolerende mekanismer, som kan føre til artsdannelse, kan virke enten før (pre-zygotisk), under eller etter (post-zygotisk) parring (Coyne og Orr 2004).

Seksuell seleksjon er en av mekanismene som kan stå bak artsdannelse (Higashi et al. 1999) og kan forklare hvordan ulike sekundære karaktertrekk dukker opp hos hanner under parringssesongen, som for eksempel utviklingen av blå øyne og rød hake hos trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) (Wootton 1976) eller de skinnende fargene til Afrikanske ciklider (Jordan 2007). Hunnens partnervalg er viktig innenfor seksuell seleksjonsteori (Bakker og Milinski 1991), og i mange arter baserer hunnens partnervalg seg på i hvilken grad hannens sekundære seksuelle karakterer er uttrykt (Andersson 1994).

Trepigget stingsild blir maks 10 cm lang, er kryptisk farget og holder til i nordlige og tempererte regioner av den nordlige halvkule, der de finnes i marine kystområder, brakkvann og i et vidt spekter av ferskvannshabitat (Wootton 1976). Marine trepigget stingsild har kolonisert ulike ferskvannshabitat gjentatte ganger og denne koloniseringen har ført til ulikheter innen trekk som morfologi, atferd, fysiologi og livshistorier (McKinnon og Rundle 2002). De adaptive endringene artene har gjennomgått siden siste istid har i noen tilfeller ført til artsdannelse (Boughman 2007). Dette gjør trepigget stingsild til en god modellorganisme for å undersøke de ulike mekanismene bak artsdannelse og det er vist gjennom forsøk i laboratorium, at delvis reproduktiv isolasjon kan evolvere hurtig hos stingsild (Rice og Hostert 1993). Forskning har også vist at seleksjon i form av divergent naturlig seleksjon eller seksuell seleksjon, er hovedårsaken til artsdannelse i motsetning til ulike flaskehalsmodeller og genetisk drift (McKinnon og Rundle 2002).

Trepigget stingsild er dekket med benplater på hver side av kroppen, senere kalt laterale plater. Antall laterale plater gir variasjoner mellom ulike populasjoner av stingsild og det er vanlig å gruppere variasjonen innenfor tre ulike morfer (Wootton 1976) (figur 1). Den ene, omtalt som lavplate senere, omfatter individer som har færre enn ni laterale plater og har ikke noe form for kjøl nederst på halen. Kjøl betegner laterale plater som har vridt seg nederst på halen slik at de står ut som en slags kjøl på hver sin side av halen. En annen

variant, senere omtalt som fullplate, har komplett antall plater og en velutviklet kjøl. Den tredje morfen er en mellomting, senere omtalt som intermediær, der individene har regioner som er plateløse, men de har flere enn 9 plater og kjøl.



Figur 1. Oversikt over de tre ulike morfene av trepigget stingsild, med laterale plater, og fravær eller tilstedeværelse av kjøl. Kjølens er illustrert etter hver fisk, figuren viser halen sett ovenfra med platene som står ut på hver side. Illustrasjonene viser A) lavplatemorf, B) intermediærmorf og C) fullplatemorf (Wootton 1976)

Hos populasjoner av trepigget stingsild i ferskvann er det en rask og gjentakende reduksjon av de laterale platene, parallell evolusjon (Colosimo et al. 2005). Hvilke økologiske mekanismer som står bak denne utviklingen er usikkert og det er foreslått hypoteser for disse mekanismene, deriblant at antall laterale plater korrelerer med salinitettoleranse (Heuts 1947). Forekomsten av populasjoner med komplett antall plater i ferskvann gjør denne hypotesen omdiskutert. En annen mulighet er at reduksjonen av antall plater i ferskvann er forårsaket av seleksjon for raskere vekstrate hos juvenile individer (Marchinko og Schluter 2007) og raskere svømmehastighet (Bergstrøm 2002), og på grunn av større predasjonsfare i marine miljø og innsjøer med store pelagiske soner er det selektert for et større antall plater i slike miljø (Marchinko og Schluter 2007).

Under gytesesongen utvikler trepigget stingsild en midlertidig dimorfisme i form av at hannene blir rød på hake og buk, og utvikler blå øyne, mens hunnene forblir kryptiske. Studier har vist at hunner foretrekker hanner med sterkest rødfarge (McLennan 1991; McLennan og McPhail 1990; Bakker og Milinski 1991, Bakker og Mundwiler 1994). Stingsild danner rødfargen av karotenoider, et fargestoff kroppen ikke kan produsere selv, hannene er derfor avhengig av å spise karotenoid rik mat for å opprettholde den røde gytefargen (Wedekind et al. 1998). Studier har vist en korrelasjon mellom hannens

helsetilstand og intensitet av rødfarge (Milinski og Bakker 1990; Frischknecht 1993). Det er også en mulig koevolusjon mellom det røde signalet hannene sender ut og hunnens oppfatning av det, da det er vist at terskelen for å respondere på røde bølgelengder er lavere blant hunner i gytesesongen enn ellers i året (Smith et al. 2004).

Gytesesongen for trepigget stingsild er lang, og varer i månedene april til august (Sokolowska og Kulczykowska 2006). Når gytesesongen starter etablerer hannen et territorium og bygger reir av ulikt organisk materiale som alger og pinner limt sammen av et protein dannet i leveren (spiggin) (Jakobsson et al. 1999). Trepigget stingsild har ritualisert atferd under reproduksjon, parringslek, i form av ulike display som at hannen svømmer i sikksakk (dans) mot hunnen, hannen vifter sand med halen og hannen svømmer gjennom reiret (Östlund-Nilsson 2007).

I min studie har jeg undersøkt partnervalg blant hunner fra tre ulike morfer av trepigget stingsild, der to (intermediær- og fullplatemorf) lever sammen i brakkvann, Engervannet, mens den tredje (lavplatemorf) lever i ferskvann, Sandvikselven. Hunnene fikk mulighet til å velge partner blant tre ulike hanner, en fra hver morf, og valget hennes ble kun basert på syn. Studiet har undersøkt om det er tegn til pre-zygotiske barrierer mellom de tre morfene, i form av selektiv partnervalg hos hunnene. Velger hunnene partner med samme morf som seg selv?

Engervannet er på havnivå og er sterkt påvirket av flo og fjære, det er derfor rimelig å anta genflyt mellom individer i Engervannet og marine individer. Det forekommer sannsynligvis ingen genflyt fra Engervannet til området i Sandvikselven grunnet en rekke fosser og dammer, men genflyt kan forekomme fra elven til Engervannet. En mulig artsdannelse vil derfor kunne være parapatrisk for lavplatemorfen i Sandvikselven, mens sympatrisk for intermediærmorf og fullplatemorf i Engervannet. Siden trepigget stingsild er opprinnelig en marin art (Wootton 1976) er det nærliggende å anta at en eventuell artsdannelse har kommet lenger hos den parapatriske morfen i Sandvikselven enn de to sympatriske morfene i Engervannet.

Det er ikke gjort studier i disse områdene tidligere og det er heller ikke blitt gjort liknende forsøk ved Universitetet i Oslo, dette kan derfor regnes som et pilotforsøk. I tillegg til å se om det er tegn til tidlig artsdannelse hos de ulike morfene i Engervannet og Sandvikselven, er også studiet en utprøving av metode.

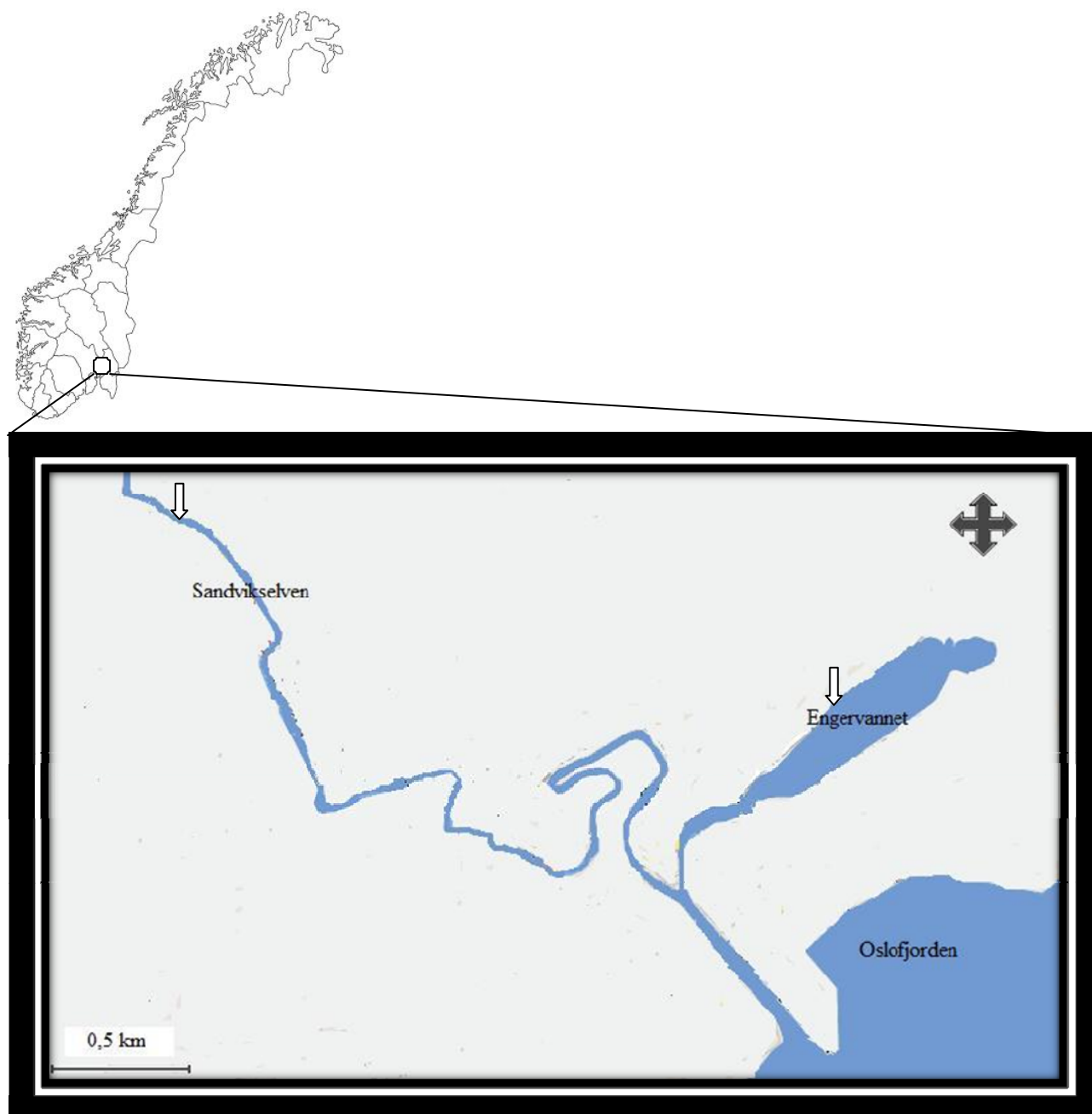
2 Materialer og metoder

2.1 Fangstområder og fisk

Fisken benyttet i denne oppgaven ble fanget i Engervannet og Sandvikselven (figur 2).

Engervannet ligger nederst i Øverlandselven og renner ut i Sandvikselven før de har felles utløp i havet. Engervannet er grunt (maksimum 3 meter) og svært næringsrikt (Halvorsen et al. 2005). Vannet ligger ved havnivå og er sterkt påvirket av saltvann, det er derfor å betrakte som brakkvann. Saliniteten i Engervannet varierer mye avhengig av flo og fjære, og vannstanden i tilløpselven, Øverlandselven. Kun et fåtall fisk har klart å tilpasse seg disse variasjonene, deriblant nipigget stingsild (*Pungitius pungitius*), to arter kutlinger (*Pomatoschistus* sp.) skrubbeflyndre (*Platichthys flesus*) og tre ulike morfer av trepigget stingsild (henholdsvis lavplate, intermediær og fullplate) (Halvorsen et al. 2005). Fisken som ble benyttet til eksperimentene i denne oppgaven var to ulike morfer av trepigget stingsild, fullplate og intermediære. Fisken ble fanget langs hele den vestre bredden av Engervannet.

Sandvikselven har utløp i havet, og er derfor påvirket av saltvann i de nedre områdene av elven. Elven er en viktig lakse- (*Salmo salar*) og sjøørretelv (*Salmo trutta*) (Borch et al. 2005). Fisken brukt i denne oppgaven ble fanget i et område ca. 3 km nordvest fra Engervannet (figur 2). Området er ikke påvirket av saltvann, og det er kun funnet trepigget stingsild med få plater i dette området (personlig meddelelse K. Østbye).



Figur 2. Kartet viser de to innsamlingsområdene, og deres felles utløp i havet. Fisken ble samlet langs hele vestre bredden av Engervannet (Kartet er hentet fra gulesider.no og redigert i Paint).

Fisken ble fanget med ruser av plexi-glass, åtet med cheddarost, i perioden mai til juli 2007. Fisken ble transportert umiddelbart til akvarieavdelingen ved Universitetet i Oslo og oppbevart i kar (250 liter) merket med fangstområde. Siden Sandvikselven er ferskvann, og individer i Engervannet er vant til store variasjoner i salinitet ble all fisken oppbevart i ferskvann fra Maridalsvannet.

De ulike morfene av trepigget stingsild hentet i Engervannet ble sortert ved å bedøve fisken med benzocain og legge dem under lupe i en petriskål med kaldt vann. Platene ble telt, og individene delt inn i de ulike morfene (figur 3). All fisken ble delt inn i modne hanner (rød hake og blå øyne, senere omtalt som gytefarger) og modne hunner (synlig med egg) (figur 4). De individene som ikke passet til denne beskrivelsen ble satt tilbake i karene igjen. Etter sortering ble fiskene introdusert til et nytt rom der forsøkene ble gjennomført.

A)

Morf	Lokalitet	Beskrivelse
Lavplate	Sandvikselven	Færre enn 9 laterale plater, ingen kjøll
Intermediær	Engervannet	Regioner uten laterale plater, har kjøll
Fullplate	Engervannet	Komplett antall laterale plater, har kjøll

B)

Morf	Bilde
Lavplate	 Hunn, 6,4 cm
Intermediær	 Hunn, 5,6 cm
Fullplate	 Hunn, 6,0 cm

Figur 3. Oversikt over de tre ulike morfene, der A) viser lokalitet og beskrivelse og B) gir eksempel på tre hunner av de ulike morfene der alle tre har vært med i forsøk.



Figur 4. Bilder som viser eksempler på gytefarger hos A) to ulike hanner i form av blå øyne og rød hake og B) en moden hunn med buken full av egg. Disse tre individene var alle med i forsøk.

Før fisken ble introdusert i forsøksoppsettet ble de oppbevart i ulike akvarier, der hunnene ble oppbevart i to 440 liters akvarier, og hannene ble plassert i akvarier i størrelse fra 37 liter opp til 103 liter. Hunnakvariene ble delt i to, slik at de ulike morfene fikk hver sin del og i den siste delen av hunnakvariene var det hunner som ble brukt til stimulering av hannene. Totalt i hvert av de to akvariene var det aldri mer enn 30 individer. I de minste hannakvariene var hannene alene, mens i de største var akvariet delt i to med en hann i hver del. All fisken ble tildelt ly i form av knuste blomsterpotter, og hannene fikk også utdelt en petriskål med sand og organisk materiale til reirbygging. Akvariene brukt til oppbevaring før forsøk blir senere omtalt som venteakvarier.

I samtlige akvarier ble det skiftet vann annen hver dag (1/3 av vannet ble skiftet), og hvert akvarium ble tilført luft. Det var lyst i rommet i 19 timer, og mørkt i 5 timer. Temperaturen i akvariene var på rundt 17,5 °C. Fisken ble matet med fjærmygglarver (*Chironomidae sp*) to ganger daglig.

For at hannene skulle opprettholde sine gytefarger, og dermed forbli modne, ble de stimulert 1 time daglig ved å senke et norgesglass med en moden hunn ned i akvariet. Stimuleringen før forsøksperioden varte i en uke, med noe variasjon ettersom nye hanner ble introdusert i venteakvariene etter hvert. Kriteriene for hvilke hanner som deltok i forsøkene var at de var aktive under stimulering, at de hadde gytefarger i form av rød hake og blå øyne (figur 4) og at de var blitt stimulert minimum en dag før gjennomføring av forsøk. Hannene ble også valgt ut slik at de hadde omtrentlig samme lengde. Hunnene brukt til stimulering ble

ikke brukt i forsøk, og i forsøksperioden ble hannene stimulert kun når de hadde en dag pause fra forsøk, siden gjennomføringen av selve forsøket ble sett på som stimulering i seg selv.

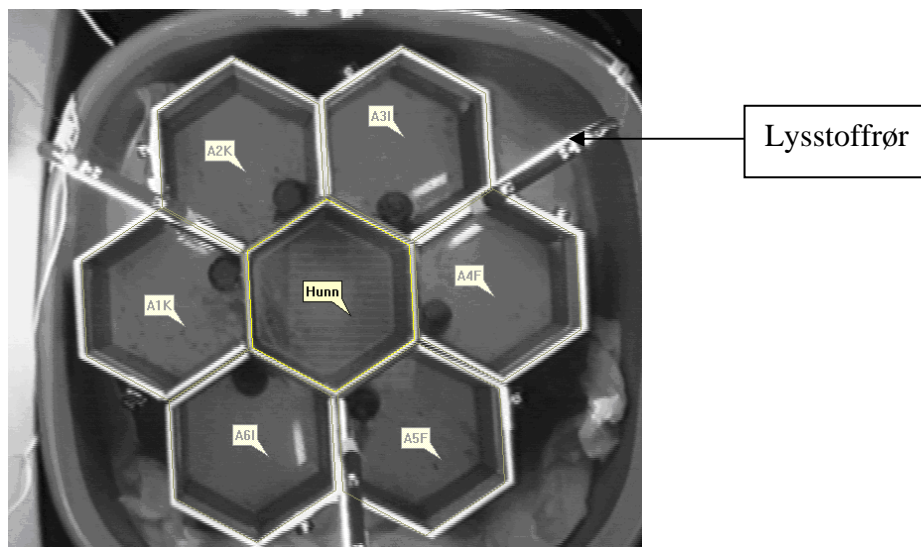
Hunnene ble i starten stimulert en time daglig med en moden hann, men etter et par dager med stimulering begynte de å slippe eggene sine. For å unngå dette ble kun nye hunner stimulert en gang. Hunnens kriterium for å delta i forsøk var at de var synlig modne (figur 4). De hunnene som slapp eggene sine under stimulering ble ikke brukt i forsøk og hannene brukt til stimulering ble heller ikke brukt i forsøk.

2.2 Forsøksoppsett

Jeg brukte to identiske forsøksoppsett for å effektivisere gjennomføringen av forsøkene, oppsettene ble merket som enten oppsett A eller B.

Ett oppsett bestod av et sekskantet akvarium (37 liter) i midten, mens seks identiske akvarier stod rundt (figur 5). I hvert av de seks akvariene (senere omtalt som hannakvarier) oppholdt det seg en hann, mens akvariet i midten var dedikert til hunner (senere omtalt som hunnakvariet). Hannakvariene ble nummerert fra 1 – 6, merket med oppsett (A eller B) og morf. For å minimere refleksjoner fra vannoverflaten og for at gjennomsynet fra hannakvariene til hunnakvariet ble bedre, ble samtlige akvarier nedsenket i et basseng med vann. For å hindre at hannene så hverandre ble alle sidene, med unntak av den som var vendt mot hunnakvariet, dekket med matte og mørke PVC-plater. Mellom forsøkene, og under kontrollen, var det løse plater mellom hannakvariene og hunnakvariet slik at hannene og hunnen så hverandre kun under forsøk. Nedsenket i bassenget, under akvariene, ble det brukt et hvitt materiale slik at fisken ble mer synlig. Hannene fikk utdelt en petriskål med sand, organisk materiale fra Engervannet og hønsenetting til reir. Over akvariene ble det montert et videokamera med 4 mm linse og forsøkene ble tatt opp på VHS og til belysning ble det brukt tre lysstoffrør.

Det ble skiftet vann annen hver dag (1/3 av vannet ble skiftet), og for å unngå forstyrrelse under filming og at reirene skulle rotes rundt, var det ingen lufttilførsel i disse akvariene.



Figur 5: Forsøksoppsett A, sett ovenfra, med ett hunnakvarium i midten og seks hannakvarier rundt. Bildet viser også hannenes reir i form av organisk materiale i en petriskål, og tre lyskilder i form av lysstoffrør. Hannakvariene ble nummerert (1-6), merket med forsøksoppsett (A eller B) og morf (K= lavplate, I= intermediær og F= fullplate). Bildet er tatt uten fisk.

2.3 Forsøk

Forsøkene ble gjennomført i perioden 13. juli til og med 18. juli, 2007.

Et forsøk bestod av tre hanner, en fra hver morf, som var plassert i enten akvarier merket med oddetall eller partall i enten oppsett A eller B. Det vil si at hannene fra oppsett A i akvariene 2, 4 og 6 tilhørte et forsøk, mens hannene i 1, 3 og 5 tilhørte et annet. Under et forsøk ble det brukt tre hunner, en fra hver morf. Hannene ble tilfeldig plassert i de ulike akvariene ved loddtrekning og rekkefølgen hunnene deltok i forsøkene var også tilfeldig trukket for hvert forsøk.

Hannene oppholdt seg i samme akvarium gjennom hele forsøksperioden, og målet var å bruke de samme 12 hannene gjennom hele perioden, men tre hanner måtte byttes ut (appendiks 1) der den ene døde, og de to andre ble tatt ut grunnet sopp, slik at det totale antall hanner som ble brukt var 15. Hunnene ble kun brukt en gang i forsøksperioden, og det totale antall hunner var 36.

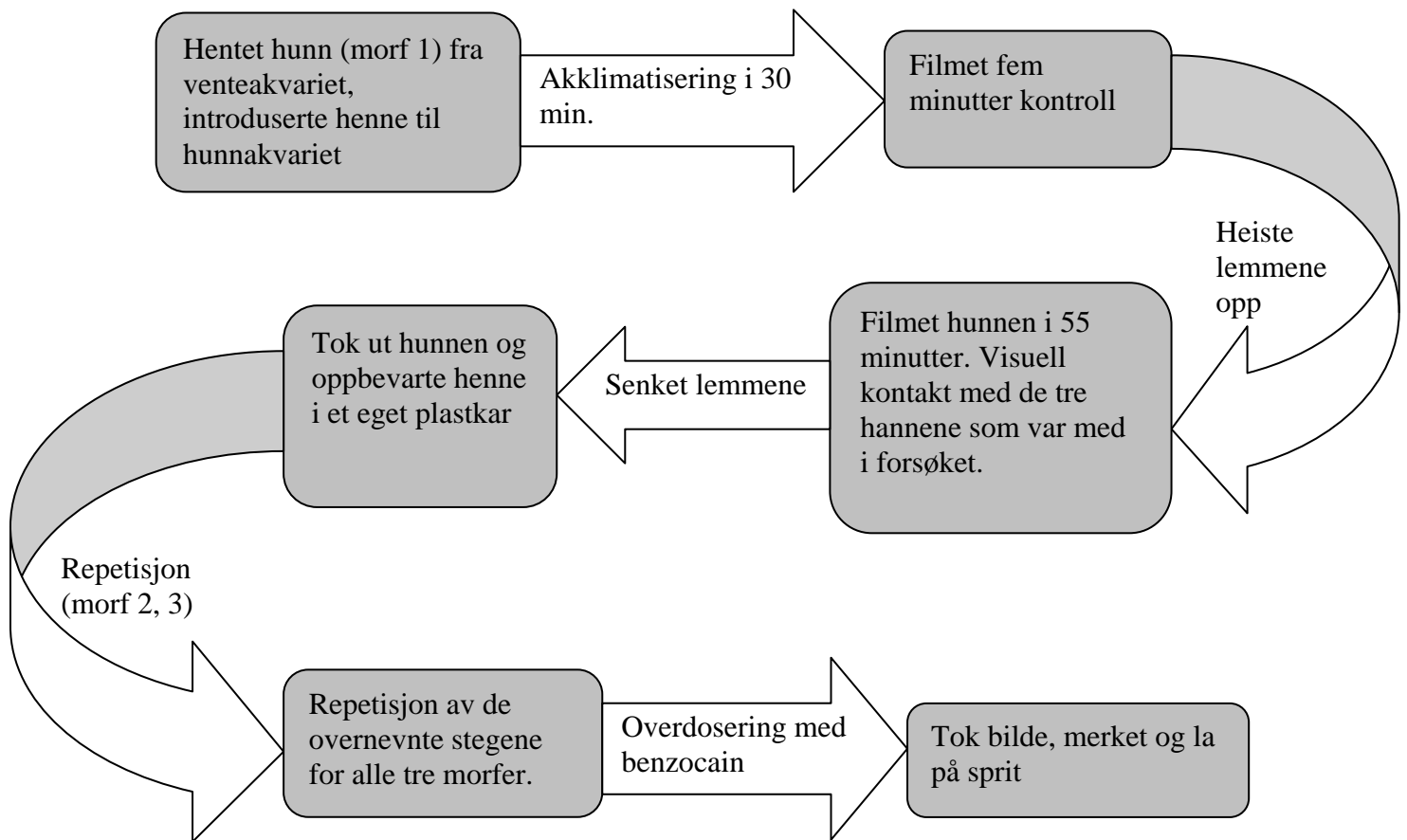
Hannene ble introdusert i hannakvariene en dag før jeg startet gjennomføringen av forsøkene, og ved hjelp av loddtrekning ble det bestemt hvilken fisk som skulle delta i forsøkene og når forsøkene skulle gjennomføres (tabell 1). Hannene fikk alltid en dag pause til neste gang de skulle i forsøk. Det ble gjort to forsøk hver dag, henholdsvis på formiddagen

og ettermiddagen. Forsøkene ble gjennomført omtrent på samme tid hver dag, rundt klokka 08.30 til 13.00 og 14.00 til 18.30.

Tabell 1: Oversikt over gjennomføring av de ulike forsøkene. Partall og oddetall står for hvilke akvarier som var med i forsøkene (for eksempel: akvariene 2, 4 og 6 i oppsett A deltok i forsøk på ettermiddagen den første dagen).

Dag	Oppsett A	Oppsett B
1	Partall <i>ettermiddag</i>	Oddetall <i>formiddag</i>
2	Oddetall <i>ettermiddag</i>	Partall <i>formiddag</i>
3	Partall <i>formiddag</i>	Oddetall <i>ettermiddag</i>
4	Oddetall <i>ettermiddag</i>	Partall <i>formiddag</i>
5	Partall <i>formiddag</i>	Oddetall <i>ettermiddag</i>
6	Oddetall <i>formiddag</i>	Partall <i>ettermiddag</i>

Gjennomføringen av et forsøk (figur 6) startet med å hente en hunn som var oppbevart i venteakvariet, hun ble så akklimatisert i hunnakvariet i 30 minutter. Denne tiden ble fastsatt etter hvor lang tid den første hunnen brukte på å roe seg. Under akklimatiseringen var lemmene mellom hannakvariene og hunnakvariet nede, slik at ingen av individene så hverandre. Jeg forlot rommet under akklimatiseringen. Det ble så filmet en kontroll i 5 minutter før jeg tok opp lemmene til de tre hannakvariene og selve forsøket var i gang. Under kontrollen satt jeg slik at hunnen ikke så meg, og jeg forlot rommet etter at jeg hadde løftet opp lemmene. Jeg kom inn i rommet en gang under filmingen for å notere meg hvordan forsøket gikk, men passet på at hunnen ikke kunne se meg. Varigheten av et forsøk var 55 minutter, så den totale tiden en hunn var i hunnakvariet var 1,5 timer. Etter endt forsøk ble lemmene satt ned igjen og hunnen tatt ut og satt i et eget plastkar før neste hunn ble sluppet i akvariet i midten igjen og prosedyren gjentok seg. Etter at et helt forsøk var over, det vil si alle de tre ulike morfene var blitt representert av hver sin hunn, fikk hunnene en overdose benzocain før de ble tatt bilde av og lagt på sprit. Dette ble gjort for 12 hele forsøk, henholdsvis 36 hunner. Etter at alle forsøkene var gjennomført fikk også hannene en overdose for så å bli tatt bilde av. Til slutt målte jeg lengde fra nese til hale på samtlige individer som deltok i forsøk.



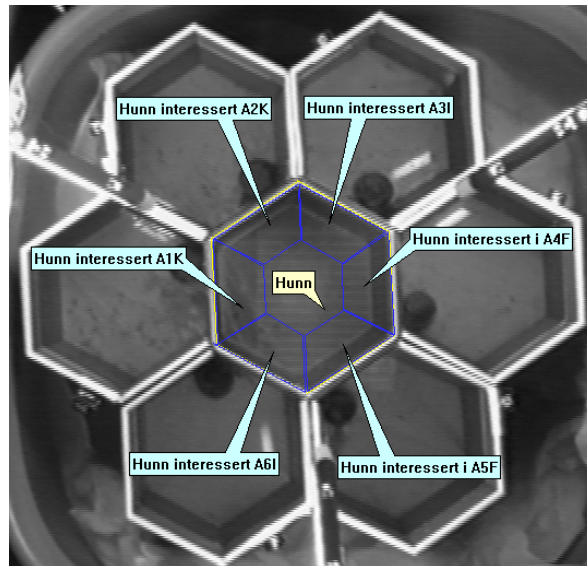
Figur 6. Oversikt over de ulike stegene for gjennomføring av et forsøk.

2.4 Kvantifisering av data

Til å kvantifisere dataene brukte jeg programmet EthoVision versjon 3.1, et program for videoanalyse som er spesialutviklet for å lokalisere individer og følge bevegelsene deres inne i egendefinerte arenaer og soner (Noldus 2005). Programmet trakk en linje mellom punkter der fisken hadde vært, slik at jeg fikk visualisert hvor fisken hadde svømt. Denne visualiseringen vil senere bli omtalt som et "track".

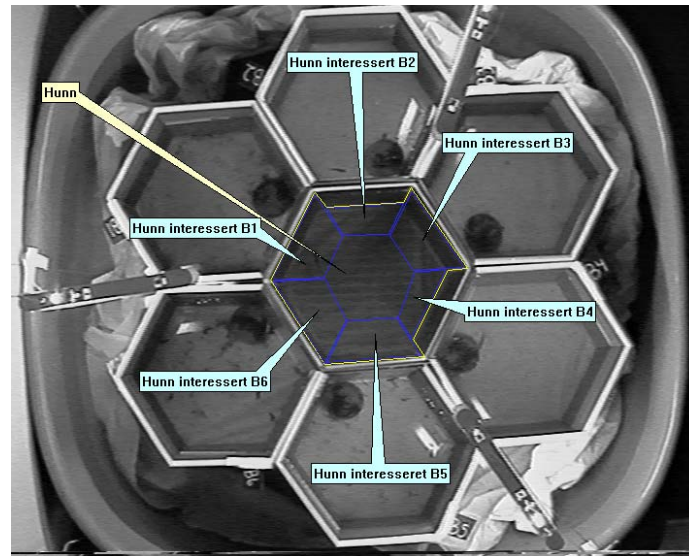
I forsøkene ble hunnakvariet i midten definert som en arena. Denne arenaen ble så delt inn seks ulike soner som ble definert som interessesoner for hunnen (figur 7). Interessesonene ble tilegnet de ulike hannene. Hvis hunnen oppholdt seg i sonen tilstøtende et hannakvarium ble dette definert som at hun viste interesse for den hannen. Området i midten, utenfor de seks interessesonene, ble bestemt som en frison. Det ble definert at hunnen ikke viste interesse for noen av hannene hvis hun oppholdt seg i denne frisonen. Programmet lokaliserer fisken

punktvis og i dette oppsettet ble en "samplingrate" (hvor ofte programmet lokaliserer fisken) på 6,250 lokaliseringer (punkter) per sekund brukt. Jeg estimerte hvor lenge hunnene var i hver av de ulike sonene, og svømmehastigheten deres (bevegelse per sekund, målt i cm/sek).



Figur 7: Forsøksoppsett A, sett ovenfra, med hunnens arena i midten(gul linje), der trapesene (blå linjer) representerer de ulike interessesoner for tilhørende hannakvarium.

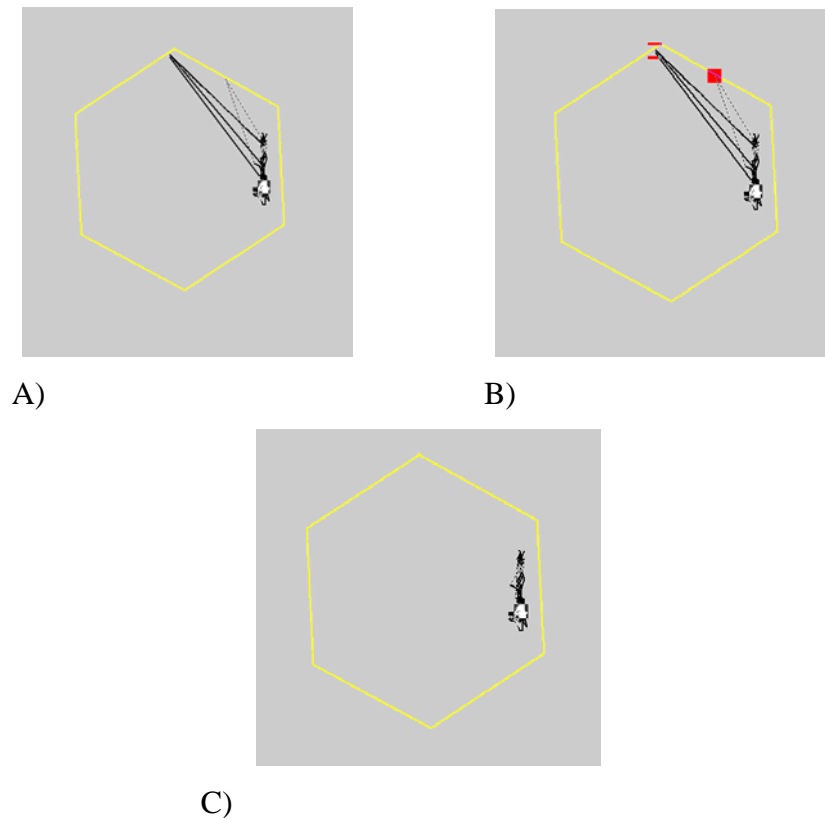
Refleksjoner fra overflaten ga visse utfordringer siden jeg brukte EthoVision til å lokalisere og "tracke" individer i vann. Programmet feillokaliserte individer, innimellom, og "tracket" refleksjoner i stedet. Selv etter mye utarbeiding av oppsettet, med lyssetting og bruk av ulike materialer til skillevegger og underlag, ble ikke alle refleksjonene fra vannoverflaten eliminerte. Jeg måtte derfor gjøre endringer av arenaen i flere av forsøkene, ved å redusere arenaen ved mørke punkter (figur 8), eller innskrenke hele arenaen. Sonene ble aldri redigerte, de var konstante gjennom hele analysen. Siden arenaen ble redusert svømte hunnene, ved noen tilfeller, ut av arenaen. Ved slike tilfeller ble det estimert hvor lenge individet var borte ved å registrere tiden når hunnen ble borte, lokaliteten der hun forsvant og når hun ble registrert igjen. I praksis ble det "tracket" en linje innenfor arenaen der hunnen ble mistet, slik at tiden ble registrert i riktig sone. Endringene vil derfor sannsynligvis ikke ha noen relevant betydning for resultatene i dette studiet.



Figur 8. Eksempel på innskrenking av arenaen (gul linje) der lemmene i hannakvarium 2 og 4 gir mørke områder som forårsaker forstyrrelser, mens sonene (blå linjer) er konstante.

Selv med de ulike utbedringene for å minske refleksjonene fra overflaten klarte jeg ikke å utelukke refleksjonene helt. Jeg måtte derfor redigere de ulike ”trackene” jeg fikk i EthoVision. Dette ble gjort etter råd og veiledning av supportsenteret til programmet og etter tips fra brukerveiledningen om slik redigering (Noldus 2005). Disse hjelpemidlene var med på å redusere de subjektive feilkildene. Redigeringen ble kun utført der refleksjoner tydelig hadde forekommet ved at programmet hadde ”tracket” en rett strek fra et punkt ved den ene kanten av akvariet til et refleksjonspunkt på den andre kanten, for så et punkt tilbake til det opprinnelige området, slik at det ble en spiss vinkel (figur 9). Disse refleksjonene var typiske og kun disse ”trackene” ble redigert. Etter å ha observert 36 timer film ble det relativt klart hva som er atypisk atferd for fiskene, og i EthoVision kan man også spille av filmen slik at man ser ”tracket” sprette fra den ene kanten til den andre. Refleksjonene ble redigert bort ved å merke hjørnet for så å slette det (figur 9). Det ble dermed estimerert et nytt ”track” mellom punktene.

Det forekom også perioder der EthoVision ikke klarte å lokalisere hunnen grunnet for liten kontrast mellom hunn og underlag. Programmet estimerte da et ”track” basert på verdier av den minste avstanden mellom punktet der hunnen ble mistet og der hun ble funnet igjen. I naturen vil det også være naturlig for fisk å ta den korteste veien mellom to punkter, gitt at tidsintervallet er kort. Ved to forsøk ble ikke ”trackene” til fire av hunnene brukbare, disse ble derfor ekskludert fra analysene (appendiks 2).

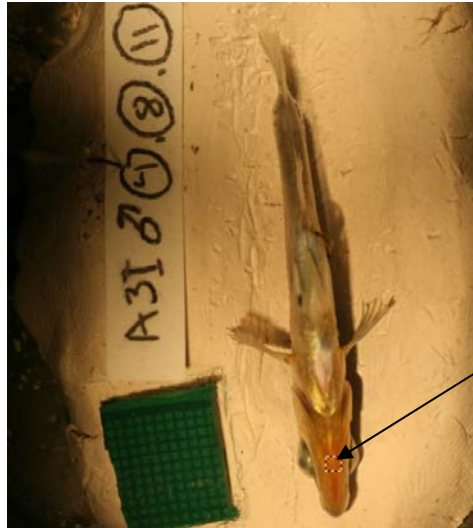


Figur 9. Redigering av et "track" med refleksjoner i EthoVision. "Tracket" er i dette eksemplet på 200 punkter, og er et utdrag av et forsøk. Den gule sekskanten er hunnens arena. A) De svarte punktene viser hunnens bevegelsesmønster, der de rette linjene (heltrukne og stiplede) med spisse vinkler er refleksjoner. B) Markerte refleksjonsvinkler. C) "Tracket" etter at refleksjonene er redigert bort.

2.5 Fargeestimering

Etter endt forsøksperiode ble det tatt bilde av brystet til alle hannene med et digitalt kamera, Canon EOS 350D. Bildene ble tatt i en fotokasse i et mørkt rom, med to lyskilder. Grunnet forskjeller i størrelse måtte vinklene til lyskildene justeres mellom individene, men intensiteten var konstant. Disse bildene ble brukt til å estimere intensiteten av rødfargen på haken til hannene, ved hjelp av bilteredigeringsprogrammet Adobe Photoshop CS2 versjon 9.0.2. Trepigget stingsild har fire typer visuelle pigmenter, med høy sensitivitet for ultraviolett (ca. 360 nm), blått (ca. 445 nm), grønt (ca. 530 nm) og rødt (ca. 605 nm) (Rowe et al. 2004). Jeg valgte derfor å bruke en metode for å estimere intensiteten til farger i RGB-skala (rødt, grønt og blått) (Villafuerte og Negro 1998). Jeg tok et område midt under haken (figur 10), og merket av dette slik at programmet kunne måle gjennomsnittlig intensitet til fargene rødt, blå og grønn i dette området. Jeg brukte formelen: $I_R = \text{rød} / (\text{grønn} + \text{blå} + \text{rød})$, slik at jeg fikk

rødfargeindeksen til de ulike hannene (Nordeide et al. 2008). Spennvidden er mellom 0 og 1, med den høyeste verdien for mest intens rød, og den laveste verdien for minst intens rød.

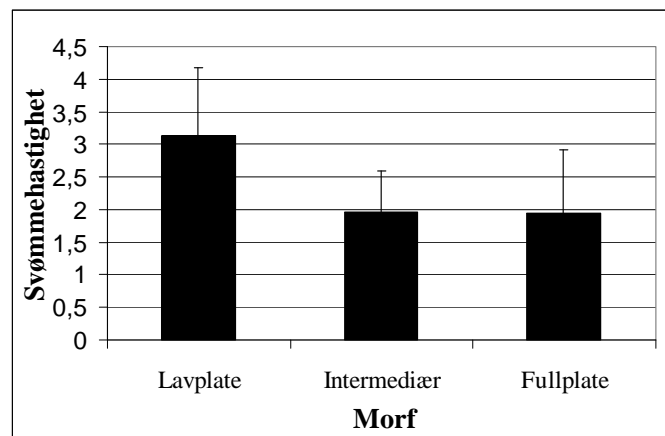


Figur 10. Det ble markert et kvadrat i et standardisert område under haken, der gjennomsnittlig intensitet av fargene grønn, blå og rød ble målt.

3 Resultater

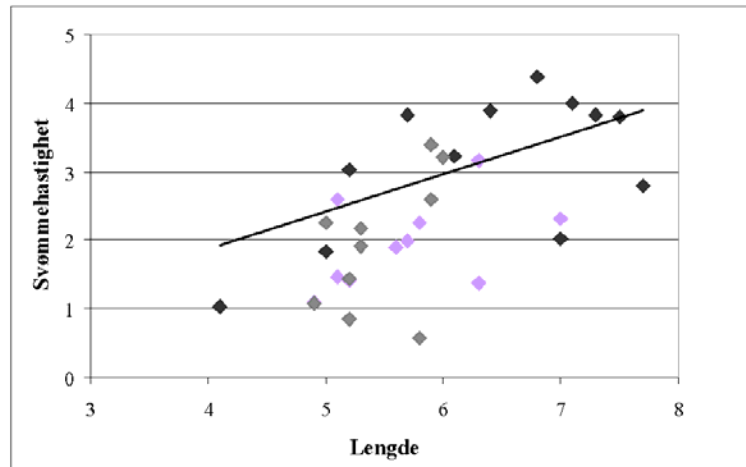
3.1 Beskrivelse av fisken

Hunnene ble tilfeldig valgt i forhold til størrelse, og det viste seg at lavplatehunner var gjennomsnittlig større enn hunner fra intermediærmorf og fullplatemorf (lavplate: $6,3 \pm 1,1$ (gjennomsnitt \pm standardavvik), intermediær: $5,6 \pm 0,6$, fullplate: $5,4 \pm 0,4$). Ved hjelp av EthoVision kunne jeg også estimere svømmehastigheten til de ulike hunnene under forsøk (figur 11). Det viste seg at lavplatehunner beveget seg signifikant raskere enn både fullplatehunner og intermediære hunner ($F_{2,29} = 6,43$ og $P < 0,005$).



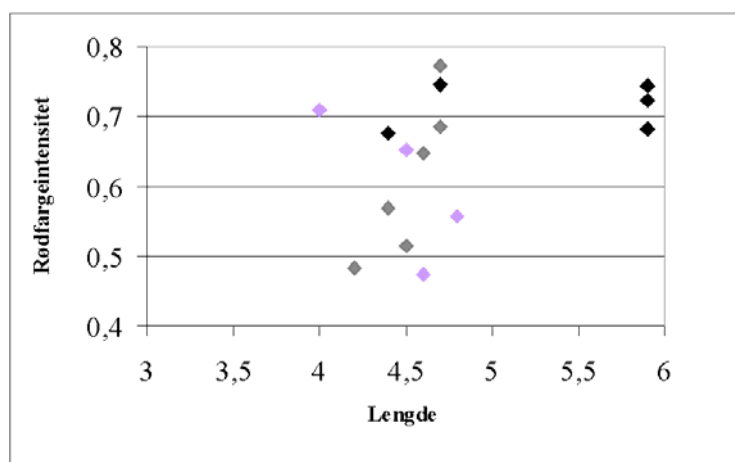
Figur 11. Gjennomsnittlig svømmehastighet, med standardavvik, til hunnene av de ulike morfene målt i cm/sek.

For å se om det var sammenheng mellom svømmehastighet og lengde ble det gjort en regresjonsanalyse som viste en signifikant sammenheng mellom lengde og svømmehastighet ($r^2 = 0,4$, $P < 0,0001$, $n = 36$) (figur 12).



Figur 12. Lengde (cm) og svømmehastighet (cm/sek) til hannene som har deltatt i forsøk (Svarte punkter= lavplate, lilla= intermediære og grå= fullplate). Regresjonslinjen viser en signifikant sammenheng mellom lengde og svømmehastighet

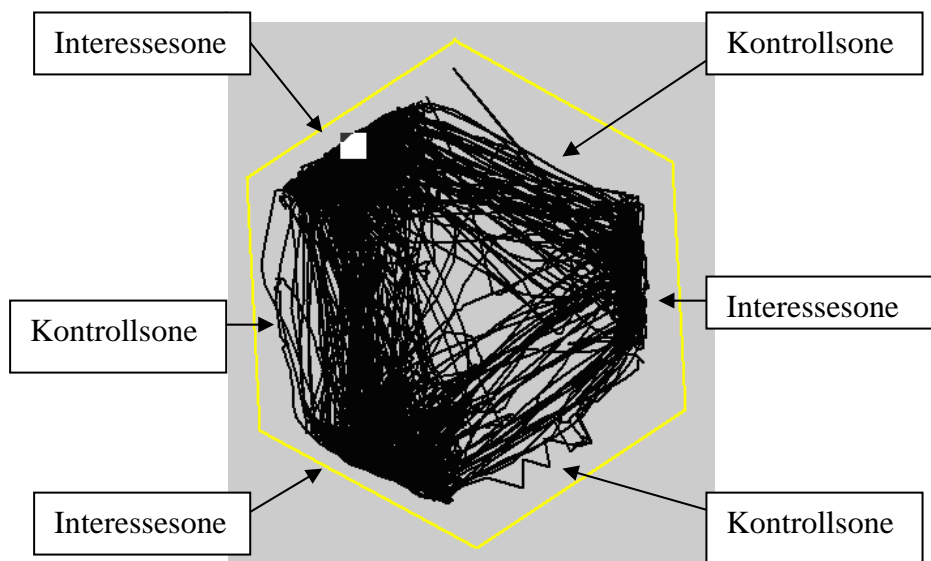
Hannene ble ikke tilfeldig valgt ut, det var dermed lite variasjon i lengde mellom de ulike morfene (fullplate: $4,5 \pm 0,2$ cm, intermediær $4,5 \pm 0,3$ cm og lavplate $5,4 \pm 0,8$ cm), men hannene ble valgt tilfeldig i forhold til intensitet av rødfarge (fullplate $0,6 \pm 0,1$, intermediær $0,6 \pm 0,1$ og lavplate $0,7 \pm 0,03$). For lavplatemorf og intermediærmorf var det mye variasjon i fargeintensitet innad i gruppen, mens lavplatemorfen hadde generelt individer med høye verdier, og lite variasjon. En variansanalyse viste at det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike morfene i rødfargeintensitet ($F_{2,12} = 2,42$, $P > 0,1$), og det var heller ingen signifikant sammenheng mellom lengde og fargeintensitet ($r^2 = 0,165$, $P > 0,1$, $n=15$) (Figur 13).



Figur 13. Lengde (cm) og rødfargeintensitet (rødfargeindeks) til de ulike hannene fra de tre morfene som har deltatt i forsøk (svarte punkter= lavplate, lilla= intermediære, grå= fullplate).

3.2 Kvalitative observasjoner

Hunnene var ubesluttomme, og det var typisk at de ble hos en hann for en liten periode der hunnen danset med hannen langs akvarieveggen, men etter en stund svømte hun til nestemann. Dette skjedde gjennom hele forsøket, og det var ingen endring i atferd mot slutten av forsøket. Men med kun et unntak (appendiks 2) var det tydelig at hunnene var mer interessert i interessesonene enn kontrollsonene (figur 14).

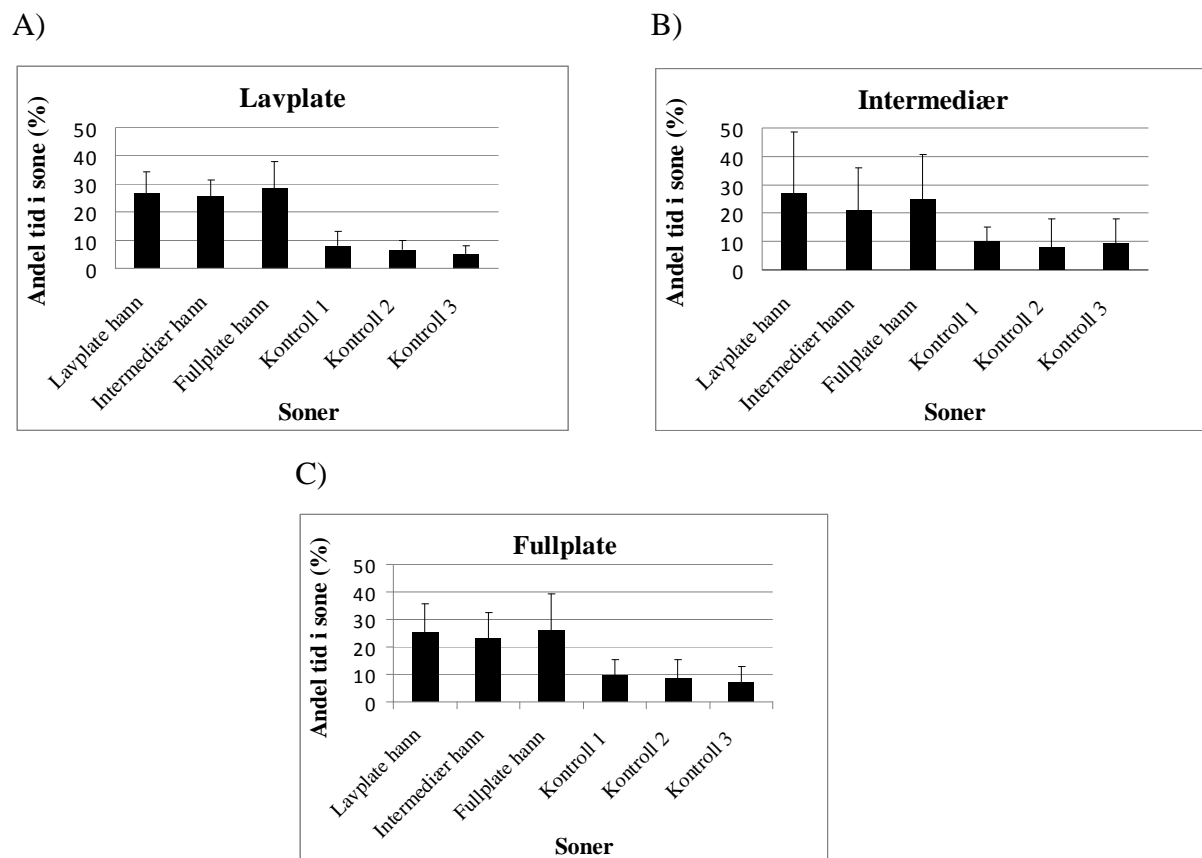


Figur 14. Eksempel på et "track" av en lavplatehunn etter endt forsøk (55 min). Den hvite firkanten i "tracket" viser utgangspunktet til hunnen ved forsøkets start. Boksene med piler viser de ulike sonene i dette forsøket, og "tracket" tyder på at hunnen er mer i interessesonene enn i kontrollsonene.

Samtlige hanner viste interesse for hunnene både under stimulering og under forsøk. Jeg observerte dans hos samtlige, der noen av hannene danset sikksakk mot hunnen, og samtlige danset sideveis sammen med hunnen langs akvarieveggen. Hannene oppholdt seg som oftest aktivt i nærheten av hunnakvariet under hele forsøket, i forhold til under kontrollen da hannene ofte oppholdt seg mot midten eller innerst i hannakvariet.

3.3 Kvantitative observasjoner

Ved hjelp av analyseverktøyet i EthoVision estimerte jeg hvor lenge hver enkelt hunn hadde vært i de ulike sonene (appendiks 2), jeg brukte dette til å finne ut hvor stor andel tid de ulike morfene brukte i de ulike sonene (Figur 15). En t-test, gjort på gjennomsnittlig tid brukt i interessedsonene mot gjennomsnittlig tid brukt på kontrollsonene, viste at hunnene var signifikant mer i interessedsonene enn i kontrollsonene (t-test: $t_{62} = 13.8$, $P < 0.001$). For å se om hunnene var mer hos en av hannene i forhold til de andre ble det gjort variansanalyser (ANOVA) hvor det ble testet for gjennomsnittlig tid hunnene, innen hver morf, brukte i de ulike interessedsonene. Det var ingen signifikante forskjeller i forhold til hvilken hann hunnene var hos, for alle tester var $P > 0,5$, hunnene hadde ikke gjort noe partnervalg.

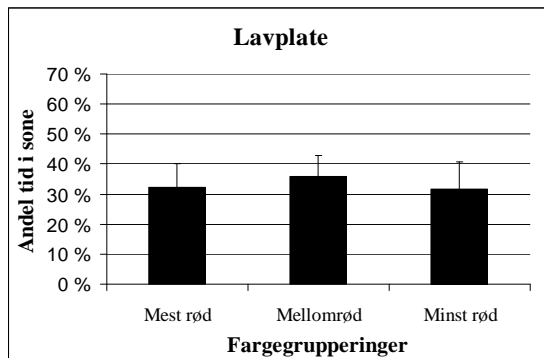


Figur 15. Tidsbruk (prosent av totaltid: gjennomsnitt \pm standardavvik) innen de ulike sonene for A) lavplatehunner, B) intermediærehunner og C) fullplatehunner.

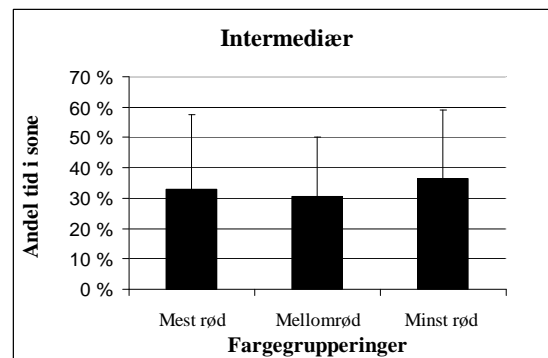
Hannene i hvert forsøk ble delt inn i tre fargekategorier, henholdsvis mest rød, mellomrød og minst rød (figur 16). Hunnene gjorde heller ingen partnervalg med hensyn på

fargeintensitet, og en variansanalyse viste at det var ingen signifikant forskjell i rødfargeintensitet hos hannene i de tre morfene ($F_{2,12} = 2,42$ og $P > 0,1$).

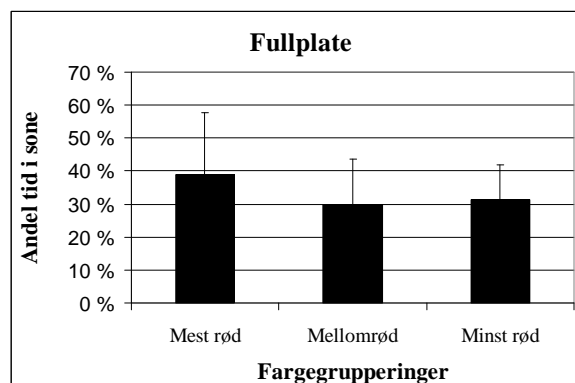
A)



B)



C)



Figur 16. Tidsbruk (prosent av totaltid: gjennomsnitt \pm standardavvik) innen de ulike sonene der hannene var gruppert etter kategoriene mest rød, mellomrød og minst rød for A) lavplatehunner, B) intermediære hunner og C) fullplatehunner

4 Diskusjon

Dette studiet har undersøkt hunnenes partnervalg hos tre ulike morfer av trepigget stingsild, henholdsvis lavplatehunner, intermediærehunner og fullplatehunner. Hunnene i forsøket fikk mulighet til å velge mellom tre hanner, en fra hver morf, i et simultant forsøk der partnervalget kun ble basert på synsinntrykk. Det viste seg at hunnene ikke gjorde noe partnervalg. Hunnene var imidlertid signifikant lenger i interessesonene enn i kontrollsonene, noe som tyder på at oppsettet fungerte ved at hunnene så hannene og de interagerter med hverandre, men hunnene mangler antakelig flere stimuli for å ta et valg. Det eneste resultatet som indikerte noen forskjell mellom de tre morfene var at lavplatehunnene svømte signifikant raskere og var gjennomsnittlig større enn de to andre morfene.

4.1 Visuelle stimuli som kan påvirke partnervalg

Ulike visuelle stimuli som kan være med på å påvirke partnervalg er fenotype (i dette tilfellet morf), farge, størrelse og atferd. Disse signalene gir et komplisert inntrykk som øker hunnenes evne til å oppdage og gjenkjenne hannene (McLennan 2007). Nedenfor vil de ulike visuelle stimuli som er med i dette studiet bli diskutert hver for seg.

4.1.1 Morf

Partnervalg kan være sterkt påvirket av morf (Ólafsdóttir et al. 2006), og det som skiller de tre ulike morfene i dette studiet er antall laterale benplater. Det må nevnes at inndelingen av disse tre morfene er kunstig, særlig for intermediærmorf som har stor variasjon i antall laterale plater. Det er heller ikke blitt brukt konsekvent i litteraturen (Mattern 2007). I naturen er det ikke sikkert denne inndelingen har noe reel effekt på partnervalg, og skillet er nok ikke like skarp i praksis som i teorien. Når det er sagt er dette en vanlig inndeling (Wootton 1976) og har derfor vært brukt i dette studiet.

Resultatene viste at hunnene ikke gjorde noe partnervalg med hensyn på hvilken morf hannene var inndelt i. Det er tvilsomt at hunnen kan se forskjell på de tre morfene kun ved

antall laterale plater, men ved å se på morfologiske forskjeller utover benplatene og forskjeller i parringsatferd, vil man få et mer helhetlig bilde av de ulike morfene.

En studie gjort på de samme tre morfene viser at det er signifikante forskjeller mellom lavplatemorfen i Sandvikselven, og de to morfene i Engervannet (Bjærke 2008). Samme studie fikk signifikante forskjeller mellom form også hos de to sympatriske morfene i Engervannet. Disse ulikhetene kan muligvis forklare ulike økologiske adaptasjoner, og dermed være med på å påvirke hunnens preferanser i forhold til partnervalg. Klare valg av partner kan være basert på tilpasninger til ulike miljø, og det er vist at stingsild kan velge hanner etter samme type som seg selv men som ikke trenger å komme fra samme elv (Vines og Schluter 2006).

4.1.2 Størrelse

I dette studiet ble ikke hannene tilfeldig valgt ut, men valgt etter at de skulle ha tilnærmet lik størrelse, dermed var variasjonen i størrelse hos de ulike hannene liten. Jeg forventet derfor ikke å finne noen effekt av partnervalg med tanke på størrelse, men ved senere studier kan det være interessant å undersøke størrelse og partnervalg hos de samme morfene som er blitt brukt i dette studiet. Størrelse er en viktig økologisk karakter hos mange arter og forskjeller i størrelse er ofte blitt observert mellom populasjoner (Ólafsdóttir et al. 2006; Kitano et al. 2007), og seksuell seleksjon av dette trekket kan påvirke seksuell isolasjon. Det er vist at hos sympatriske morfer innen stingsild kan artene være ulike i størrelse og størrelse påvirker ofte pre-zygotisk isolasjon (McKinnon et al. 2004). Det er imidlertid også blitt vist at flere stimuli enn kun størrelse må til for at hunnene kan gjøre et valg (Ólafsdóttir et al. 2006)

Ofte er det korrelasjon mellom fargeintensitet og lengde (Milinski og Bakker 1990; Frischknecht 1993), men det ble ikke funnet signifikant korrelasjon mellom intensitet av rødfarge og lengde i min studie. Dette resultatet er sannsynligvis påvirket av lite variasjon i lengde hos hannene, det var dermed ikke forventet å finne en slik korrelasjon. Senere studier bør undersøke om det er eventuelle sammenhenger mellom fargeintensitet og lengde ved å velge ut lengde tilfeldig.

4.1.3 Farge

Et av kriteriene for at hannene fikk delta i forsøk var at de hadde fått gytefarger i form av rød hake og blå øyne. Samtlige hanner opprettholdt gytefargene sine gjennom hele forsøksperioden slik at interessen for hunnene var gjeldende under hele studiet. Resultatene viser også at det ikke var signifikante forskjeller mellom hannenes intensitet av rødfarge, selv om lavplatehannene var gjennomsnittlig mer intense og det var lite variasjon innad i denne gruppen. Hannene ble tilfeldig valgt ut med hensyn på farge, men siden det er få hanner med i studiet er det sannsynligvis ikke tilstrekkelig data for å finne ut distinkte forskjeller mellom morfene.

For å måle intensiteten av rødfarge hos individene brukte jeg RGB-skalaen (rødt, grønt og blått) (Villafructe og Negro 1998) siden trepigget stingsild har høy sensitivitet for disse bølgelengdene (Rowe et al. 2004). Bildene som ble brukt til å måle rødfargeintensiteten hos hannene ble tatt umiddelbart etter overdosering, slik at fargen ble minst mulig påvirket av stress. Siden bildene ble tatt så raskt, og alle hannene fikk samme håndtering er det lite sannsynlig at dette kan ha påvirket resultatene.

4.1.4 Atferd

Samtlige hanner viste interesse for hunnene, og de interagerer med dem gjennom glasset ved å svømme i sikksakk (dans) mot hunnen eller dans sideveis langs akvarieveggen. Kun et fåtall av hannene var ikke i nærheten av hunnakvariet gjennom hele forsøket, og de få hannene dette gjaldt svømte straks mot hunnakvariet når hunnen kom svømmende bort. Dette påvirker sannsynligvis ikke resultatene.

Det var opprinnelig planlagt å "tracke" hannene i tillegg til hunnene, og dermed få et bedre inntrykk av atferd hos dem i forhold til hvor aktive de var og hvor mye de befant seg i nærheten av hunnakvariet. Grunnet problemer med ulik lysintensitet i akvariene og refleksjoner fra vannoverflaten lot ikke dette seg gjøre med hensyn på å bruke EthoVision programmet. Senere studier bør utbedre forsøksoppsettet slik at dette kan la seg gjøre.

4.2 Partnervalg ved andre stimuli

Hunnene i dette studiet var ubesluttsomme, dette indikerer at å bruke et oppsett der hunnene kun basere sitt partnervalg på syn ikke er gunstig for en kompleks art som trepigget stingsild. Resultatene viser at det ikke ble gjort noe valg verken av en hann av sin egen morf eller av en hann av en annen morf. Selv om resultatene ikke viser partnervalg med hensyn på morf trenger ikke det å bety at det ikke er pre-zygotiske barrierer mellom disse tre morfene. Når en art har så avansert reprodutiv atferd som trepigget stingsild, er det nærliggende å forvente at det trengs flere stimuli for å foreta et valg enn kun synet. Kjemiske signaler er ofte ansett som den eldste og mest utbredte formen for kommunikasjon (Johansson et al. 2007). Man kan derfor tenke seg at kjemiske signaler vil kunne være en viktig faktor også innen partnervalg. Det er blitt vist at lukt har en viktig funksjon med hensyn på å "lukte seg frem til" en partner med passende Mhc alleler (major histocompatibility complex) slik at avkommet får den optimale sammensetningen av disse (Milinski 2003). Feromoner har et vidt spekter av informasjon i forhold til kvaliteten til en eventuell partner og det er sannsynlig at også disse blir brukt under partnervalg (Johansson et al. 2007). Sosial interaksjon er også viktig i form av dans, vifting med halen og kontakt i form av biting (Östlund-Nilsson 2007). Andre sensoriske organer som kan være med å avgjøre partnervalg er smakssignaler, akustiske signaler og signaler oppfattet av den laterale linjen som vannstrømninger (McLennan 2007).

4.3 Hunnenes atferd

Det viser seg at det er signifikante forskjeller i svømmehastighet hos lavplatehunner i forhold til intermediærehunner og fullplatehunner. I gjennomsnitt beveger lavplatehunnene seg mer enn 1 cm lenger per sekund enn de to andre morfene. Tidligere forskning har vist en negativ korrelasjon mellom svømmedyktighet og antall laterale plater, noe som støtter hypotesen om at platereduksjon er forbundet med økt hydrodynamisk effektivitet (Bergström 2002). Det kan tenkes at lavplateindivider oppholder seg i mer beskyttede og bentiske områder i ferskvann, der de har tilgang til å gjemme seg for predatorer. De kan derfor ha blitt selektert for raskere vekstrate og raskere svømmehastighet slik at de har mulighet til å unngå en predator. Individene i Engervannet er muligens mer pelagiske og trenger mer beskyttelse i form av en rustning slik at de har større sannsynlighet for å overleve et angrep (Reimchen 2000). Det er

mer sannsynlig at fullplateindivider og intermediæreindivider overlever et angrep enn for lavplateindivider, det vil derfor mest sannsynlig bli selektert for individer med rask svømmehastighet hos lavplatemorfen. Ved å se på forholdet mellom lengde og svømmehastighet i dette studiet ser man en signifikant korrelasjon, det vil si at større fisk svømmer raskere. Det viser seg også at lavplateindivider er generelt større enn individer fra Engervannet, noe som kan støtte hypotesen om at platereduksjon fremmer hurtigere vekst (Marchinko og Schluter 2007), eller at individene er fra ulike årsklasser.

4.4 Eksperimentelt design

Det var hensiktsmessig å bruke et simultant oppsett, siden studiet undersøkte partnervalg der hunnen hadde tre ulike hanner å velge mellom. På den annen side er det blitt vist at hunner av trepigget stingsild rangerer hanner som er blitt presentert etter hverandre i forhold til deres farge (Bakker og Milinski 1991), og i samme studie ble det også vist at hvor attraktiv den ene hannen var har en signifikant effekt på hvordan hunnen rangerer neste hann. Hunner av trepigget stingsild viser seg dermed å være avanserte i sitt partnervalg, og det hadde derfor vært mulig å benytte et sekvensert oppsett i stedet. Et slikt oppsett ble allikevel vurdert til å ikke være interessant for dette studiet, siden det kun er partnervalg jeg er ute etter og ingen rangering av hannene utover det.

I studiet fikk hunnene 55 minutter til å utforske hannene og eventuelt gjøre et valg. Resultatene mine viser at hunnene ikke har gjort noe klart valg. Hvis hunnen kun hadde fått et par minutter til rådighet ville muligens resultatene mine sett annerledes ut i forhold til valg av partner. Det positive ved å la hunnen få så lang tid er at jeg får sett om hunnene er vinglete eller om de faktisk blir hos en hann lenger enn en annen, det vil si gjør et partnervalg. Det negative er at det virker som at hunnene gir opp etter en stund og svømmer til neste hann, det kan derfor være at de ikke er ubesluttomme, men at de trenger en kjede med ulike stimuli som ikke blir oppfylt ved at det er et glass i mellom hunn og hann. Da jeg analyserte innspillingene av forsøkene var ofte hunnene hos en hann over en periode for så å svømme over til neste hann, det var ikke slik at de kun svømte rundt og rundt, men de ble litt og danset langs glasset hos de ulike hannene. Ved å ha et kortere tidsintervall kunne jeg ha fått resultater som indikerte et valg, men som muligens var lagt på falske premisser ved at hunnene tilfeldigvis var lenge hos han akkurat da jeg filmet. På en annen side velger nok hunnene en partner relativt raskt for å hindre bruk av unødvendig energi.

Som nevnt tidligere, et oppsett kun basert på syn er nok ikke det mest optimale for en kompleks art som trepigget stingsild. Et nytt og effektivt oppsett er å la hunnene svømme fritt rundt de ulike hannene, mens hannene er atskilt fra hverandre ved at de blir festet med en liten tråd rundt en av piggene sine slik at hannene ikke får interagert med hverandre. Da kan hunnene svømme fritt og basere valget sitt på alle de ulike stimuliene som blir brukt under partnervalg i deres naturlige omgivelser (Östlund-Nilsson og Nilsson 2000), et annet forslag er å la hannene være inne i en innheining med perifererte vegger rundt, slik at kjemiske stimuli også kommer blir brukt i tillegg til visuelle stimuli (Vines og Schluter 2007).

Den opprinnelige planen var å bruke nye hanner for hvert forsøk, men grunnet relativt høy dødelighet måtte de samme hannene (med unntak av tre) bli brukt om igjen under forsøkene. Mulige effekter ved å bruke samme hanner kan være at de mister interessen etter en stund med forsøk. For å minimere sannsynligheten for en slik effekt hadde samtlige hanner fri fra forsøk annen hver dag. I naturlige omgivelser er det vanlig at hanner gyter med flere hunner i løpet av gyteperioden (Östlund-Nilsson 2007), slik at en slik effekt er lite sannsynlig. Det er også verdt å nevne at hannene kan miste interessen under forsøket, slik at den siste hunnen ikke får like ivrige hanner å velge mellom som den første. Slike effekter ble ikke observert i mine forsøk, men man kan kontrollere for slike effekter hvis man også "tracker" hannene i tillegg til hunnene.

Den høye dødeligheten kan skyldes at forsøkene ble gjennomført i slutten av gyteperioden og at hannene er mer mottakelige for sykdom under denne perioden enn ellers. Dessuten får akvariekjelleren vann fra Maridalsvannet og temperaturen på dette vannet var betraktelig kaldere enn i Engervannet, i tillegg ble samtlige individer oppbevart i ferskvann. Dette kan ha blitt for hard påkjenning for fisken og ha forårsaket den høye dødeligheten.

Det var opprinnelig planlagt at hannene skulle ha bygget reir for at de kunne delta i forsøket, men grunnet sen gjennomføring, høy dødelighet og få individer måtte dette kravet bort. Hannen fikk utdelt reirmateriale i forsøksoppsettet slik at hunnene fikk et visuelt inntrykk av at samtlige hanner hadde en form for reir, og siden hunnene ikke fikk interagere med hannene og inspisere reiret er det lite sannsynlig at dette har noen innvirkning på resultatene. Et eventuelt problem ved å ikke ha reir er at man risikerer at hannene ikke er klare til å ta imot en hunn, slik at han ikke uttrykker korrekt parringsdisplay for hunnene.

4.3 Bruk av EthoVision for å kartlegge partnervalg

Det var opprinnelig planlagt å kartlegge atferd også hos hannene i tillegg til hunnene. I et studiet der man ønsker å undersøke reproduktiv atferd og partnervalg er det også ønskelig å dokumentere hannenes atferd. Selv om det er hunnen som tar den endelige avgjørelsen så er det også av interesse å se hvor mye energi hannene legger i partnervalget i form av atferd og tid i sone i nærheten av hunnen. I mitt oppsett var lyskildene for dårlige til at EthoVision klarte å lokalisere hannene og refleksjonene fra overflaten ble altfor store i forhold til kontrasten til hannene. Senere studier bør utbedre lyssoppsetningen av dette forsøksoppsettet og sørge for at alle akvariene er like opplyste slik at EthoVision klarer å lokalisere samtlige individer og ”tracke” dem. Et bedre lysoppsett kan være å ha en indirekte lyskilde for hvert av akvariene slik at samme lysstyrke fordeler seg i hele akvariet og man eliminerer refleksjon fra lyskilden i vannoverflaten, man kan også installere lys under hvert av akvariene. I EthoVision kan man lage flere arenaer, og det vil være optimalt å bruke en arena for hvert akvarium, lage en tilsvarende sone hos hannen som hos hunnen, og definere dette som interessesone for hannen i det akvariet.

En annen grunn til at det er viktig å utbedre forsøksoppsettet er at man alltid bør unngå å redigere dataene sine. Selv om EthoVision har gode redigeringsverktøy og tilhørende manualer er det aldri å anbefale å ta i bruk et oppsett som gir rom for subjektive feilkilder i form av partisk feilredigering. Ved å gjøre endringer i lyssettingen vil man kunne eliminere nødvendigheten av å redigere, slik jeg måtte i dette studiet. Ved neste studie bør også videokameraene være koblet direkte til pc-en, slik at kvaliteten på filmen blir bedre. Ved en slik direkte tilkobling vil man også kunne observere problemer underveis, og lettere endre på oppsettet slik at det blir optimalt før gjennomføring av forsøk.

Andre mer generelle problemer EthoVision har er at kunstige farger og materialer må brukes i arenaen for å få nok kontrast slik at EthoVision får ”tracket” individene (i dette forsøket måtte sanden droppes til fordel for et hvitt materiale under akvariene) og at lyskildene må være nøye planlagt (Delcourt et al. 2006). Fordelene med programmet er at det minker arbeidsmengden for brukeren ved at man kan bestemme hva man vil finne ut, og få ut data fra flere områder samtidig (som i dette studiet der jeg brukte både tid i sone, og svømmehastighet) og man kan ”tracke” flere individer simultant.

5 Konklusjon

Hunnene i studiet gjorde ingen signifikante partnervalg. I dette studiet fikk hunnene kun benyttet seg av syn ved sitt partnervalg, dette utelukker en rekke andre stimuli som kan være nødvendige for å velge partner. Et forsøksoppsett uten barrierer mellom hunnene og hannene vil kunne være optimalt for å kartlegge en eventuell pre-zygotisk isolasjon i form av selektiv partnervalg hos de tre morfene i dette studiet. Videre forskning vil være nødvendig for å kartlegge om det finnes pre-zygotiske barrierer mellom disse morfene.

Referanser

Adobe Photoshop CS2 versjon 9.0.2

Andersson, M. (1994): "Sexual selection". Princeton: Princeton University Press

Bakker, T. C. M. og Milinski, M. (1991): "Sequential female choice and the previous male effect in sticklebacks". *Behavioral ecology and sociobiology* **29** 205-210

Bakker, T. C. M. og Mundwiler B. (1994): "Female mate choice and male coloration in a natural three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) population". *Behavioral ecology* **5** 74-80

Bergstrøm, C. A. (2002): "Fast-start swimming performance and reduction in lateral plate number in threespine stickleback". *Canadian journal of zoology* **80** 207-213

Bjærke, O. (2008): "Divergent foraging behaviour and shape in lateral plate morphs of threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)". Masteroppgave ved Biologisk institutt, Universitetet i Oslo

Borch, H., Haarstad, K., Borgstrøm, R., Bækken, T., og Dokk, J. G. (2005): "Sandvikselva-en forurensingskartlegging av miljøskadelige forbindelser for å avdekke årsaker til redusert reproduksjon av laks og sjøørret". Jordforsk rapport **125-04**

Boughman, J. W. (2007): "Speciation in sticklebacks". I: *Biology of the Three-Spined Stickleback*. Sara Östlund-Nilsson, Ian Mayer og Felicity Anne Huntingford (red.). Boca Raton-London-New York: CRC Press. (Marine biology series)

Colosimo, P. F., Hosemann, K. E., Balabhadra, S., Guadalupoe, V. J., Dickson, M., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Schluter, D. og Kingsley, D. M. (2005): "Widespread parallel evolution in sticklebacks by repeated fixation of Ectodysplasin alleles". *Science* **307** 1928-1933

Coyne, J. A. og Orr, H. A. (2004): "Speciation". U.S.A.: Sinauer Associates

Delcourt, J., Becco, C., Yliff, M. Y., Caps, H, Vandewalle, N. og Poncin, P. (2006): "Comparing the EthoVision 2.3 system and a new computerized multitracking prototype system to measure swimming behaviour in fry fish". *Behaviour research methods* **38** 704-710

Frischknecht, M. (1993): "The breeding colouration of male three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) as an indicator of energy investment in vigour". *Evolutionary ecology* **7** 439-450

- Halvorsen, G., Often, A. og Svalastog, D. (2005): "Engervannet og Øverlandselva – statusrapport 2005". NINA minirapport **136**
- Heuts, M. J. (1947): "Experimental studies on adaptive evolution in *Gasterosteus aculeatus* L". Evolution **1** 89-102
- Higashi, M., Takimoto, G. og Yamamura, N. (1999): "Sympatric speciation by sexual selection". Nature **402** 523-526
- Jakobsson, S. Borg, B., Haux, C. og Hyllner, S. J. (1999): "An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein: the nest building glue from male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*". Fish physiology biochemistry **20** 79-85
- Johansson, B. G. og Jones, T. M. (2007): "The role of chemical communication in mate choice". Biological reviews **82** 265-289
- Jordan, R. C. (2008): "Color-based association among heterospecifics in lake Malawi rock-dwelling cichlids". Ethology **114** 272-278
- Kitano, J., Mori, S. og Peichel, C. L. (2007): "Phenotypic divergence and reproductive isolation between sympatric forms of Japanese threespine sticklebacks". Biological journal of the Linnean Society **91** 671-685
- Marchinko, K. B. og Schluter, D. (2007): "Parallel evolution by correlated response: lateral plate reduction in threespine stickleback". Evolution **61** (5) 1084-1090
- Mattern, M. Y. (2007). "Phylogeny, systematics, and taxonomy of sticklebacks". I: Biology of the Three-Spined Stickleback. Sara Östlund-Nilsson, Ian Mayer og Felicity Anne Huntingford (red.). Boca Raton-London-New York: CRC Press (Marine biology series)
- McKinnon, J. S. og Rundle, H. D. (2002): "Speciation in nature: the threespine stickleback model systems". Trends in ecology & evolution **17** 480-488
- McKinnon J.S., Mori, S., Blackman, B. K., David, L., Kingsley, D. M., Jamieson, L., Chou, J. og Schluter, D. (2004): "Evidence for ecology's role in speciation". Nature **429** 294-298
- McLennan, D. A., og McPhail, J. D. (1990): "Experimental investigations of the evolutionary significance of sexually dimorphic nuptial colouration in *Gasterosteus aculeatus* (L.): the relationship between male colour and female behaviour". Canadian journal of zoology **68** 482-492
- McLennan, D. A. (1991): "Integrating phylogeny and experimental ethology: from pattern to process". Evolution **45** 1773-1789

- McLennan, Deborah A (2007): "The Umwelt of the Three-spined stickleback" I: Biology of the Three-Spined Stickleback. Sara Östlund-Nilsson, Ian Mayer og Felicity Anne Huntingford (red.). Boca Raton-London-New York: CRC Press (Marine biology series)
- Milinski, M. og Bakker, T. C. M. (1990): "Female sticklebacks use male coloration in mate choice and hence avoid parasitized males". *Nature* **344** 330-330
- Milinski, M. (2003): "The function of mate choice in sticklebacks: optimizing Mhc genetics". *Journal of fish biology* **63** 1-16
- Noldus (2005): "EthoVision video tracking system for automation of behavioral experiments, reference manual version 3.1". Nederland: Noldus information technology
- Nordeide, J. T., Mohus, Å., Nicolaisen, O., Volden, R. og Egeland, E. S. (2008): "Offspring or ornaments? Is caortenoid-based ornamentation in female Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), condition-dependent and traded off against offspring?". *Ecology of freshwater fish* **17** 328-339
- Ólafsdóttir, G. Á., Ritchie, M. G og Snorrason, S. S. (2006) "Positive assortative mating between recently described sympatric morphs of Icelandic sticklebacks". *Biology letters* **2** 250-252
- Oxford dictionary of biology (2004). Oxford-New York: Oxford University Press
- Reimchen, T. E. (2000): "Predator handling failures of lateral plate morphs in *Gasterosteus aculeatus*: functional implications for the ancestral plate condition". *Behaviour* **137** 1081-1096
- Rice, W.R. og Hostert, E. E. (1993): "Laboratory experiments on speciation – what have we learned in 40 years". *Evolution* **47** 1637-1653
- Rowe, M. P., Baube, C. L., Loew, E. R. og Phillips, J. B. (2004): "Optimal mechanisms for finding and selecting mates: how threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) should encode male throat colors". *Journal of comparative physiology a-neuroethology sensory neural and behavioral physiology* **190** 241-256
- Smith, C., Barber, I., Wootton, R. J. og Chittka, L. (2004): "A receiver bias in the origin of three-spined stickleback mate choice". *Proceedings of the Royal Society of London. B, Biological sciences* **271** 949-955
- Sokolowska, E. og Kulczykowska, E. (2006): "Annual reproductive cycle in two free living populations of three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): patterns of ovarian and testicular development". *Oceanologia* **48** 103-124

- Villafuerte, R. og Negro, J. J. (1998): "Digital imaging for colour measurement in ecological research". *Ecology letters* **1** 151-154
- Vines, T. H. og Schluter, D. (2006): "Strong assortative mating between allopatric sticklebacks as a by-product of adaption to different environments". *Proceeding of the Royal Society B, Biological sciences* **273** 911-916
- Wedekind, C., Meyer, P., Frischknecht, M., Niggli, U. A. og Pfander, H. (1998): "Different carotenoids and potential information content of red coloration of male three-spined stickleback". *Journal of chemical ecology* **24** 787-801
- Wootton, R. J. (1976): "The biology of the sticklebacks". London-New York-San Francisco: Academic Press
- Östlund-Nilsson, S. og Nilsson, G. E. (2000): "Free female choice in stickleback: lack of preference for male dominance traits". *Canadian journal of zoology* **78** 1251-1258
- Östlund-Nilsson, Sara (2007): "Reproductive Behaviour in the Three-Spined Stickleback" I: *Biology of the Three-Spined Stickleback*. Sara Östlund-Nilsson, Ian Mayer og Felicity Anne Huntingford (red.). Boca Raton-London-New York: CRC Press (Marine biology series)

Appendiks

Appendiks 1: Oversikt over forsøk for hanner

Identitet hanner: A/B= oppsett, 1-6= tilhørende akvarium, (1)-(12)= forsøksnummer.
Intensitet av rødfarge, lengdemål og morf. * viser de tre hannene som måtte byttes ut grunnet sopp.

Identitet hanner	Intensitet av rødfarge	Lengde	Morf	
A1Khann(4)(8)(11)	0,68	5,9	Lavplate	
A2Khann(2)(5)(9)	0,74	4,7	Lavplate	
A3lhann(4)(8)(11)	0,65	4,5	Intermediær	
A4Fhann(2) sopp	0,77	4,7	Fullplate	*
A4Fhann(5) sopp	0,65	4,6	Fullplate	*
A4Fhann(9)	0,51	4,5	Fullplate	
A5Fhann(4)(8)(11)	0,48	4,2	Fullplate	
A6lhann(2)(5)(9)	0,71	4	Intermediær	
B1Khann(1)(6)(10)	0,68	4,4	Lavplate	
B2Fhann(3)(7)(12)	0,68	4,7	Fullplate	
B3Fhann(1)(6)(10)	0,57	4,4	Fullplate	
B4lhann(3)(7)(12)	0,56	4,8	Intermediær	
B5lhann(1)(6)(10)	0,47	4,6	Intermediær	
B6Khann(3)(7) sopp	0,72	5,9	Lavplate	*
B6Khann(12)	0,74	5,9	Lavplate	

Appendiks 2: Oversikt over forsøk for hunner

Forsøksnummer, morf og hvor lenge (prosent av totaltid) hunnene oppholdt seg i de ulike sonene. * viser atypisk hunn, der hun viser betydelig mer interesse for kontrollene enn interessedesonene. * * viser de fire hunnene som ikke lot seg "tracke" av EthoVision.

Forsøksnr.	Morf hunn	Lavplate hann	Intermediaær hann	Fullplate hann	Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	
1	Lavplate	25,7	29,5	33,0	4,7	2,1	5,0	
1	Intermediaær	76,2	2,1	4,0	16,6	0,0	1,1	
1	Fullplate	30,5	28,9	19,8	10,0	5,4	5,3	
2	Lavplate	23,3	23,2	25,8	8,5	9,4	9,8	
2	Intermediaær	31,0	18,6	21,0	11,0	7,7	10,5	
2	Fullplate	12,4	16,1	63,2	3,2	1,5	3,6	
3	Lavplate	26,6	21,0	23,6	7,1	13,3	8,6	
3	Intermediaær	39,0	23,1	26,6	4,2	4,9	2,2	
3	Fullplate	24,2	27,0	32,8	6,6	5,5	3,9	
4	Lavplate	19,5	22,4	31,0	18,1	5,9	3,0	
4	Intermediaær	3,0	6,9	15,1	19,2	33,8	22,1	*
4	Fullplate	18,8	17,8	21,8	14,6	13,3	13,7	
5	Lavplate	22,1	27,7	37,2	4,1	4,2	4,6	
5	Intermediaær	9,9	9,3	61,2	5,4	6,5	7,8	
5	Fullplate	37,5	13,8	24,6	11,1	6,4	6,6	
6	Lavplate	26,6	35,1	29,6	3,3	3,8	1,7	
6	Intermediaær	34,2	50,8	8,3	5,7	0,5	0,5	
6	Fullplate	25,5	32,9	11,3	15,0	6,8	8,5	
7	Lavplate	23,9	14,6	48,7	3,3	7,2	2,4	
7	Intermediaær	2,6	16,1	37,5	14,7	4,0	25,2	
7	Fullplate	41,9	23,5	18,7	6,0	8,1	1,8	
8	Lavplate	35,8	24,0	20,9	4,0	7,1	8,3	
8	Intermediaær	x	x	x	x	x	x	**
8	Fullplate	x	x	x	x	x	x	**
9	Lavplate	44,3	34,6	13,2	4,2	2,3	1,4	
9	Intermediaær	x	x	x	x	x	x	**
9	Fullplate	x	x	x	x	x	x	**
10	Lavplate	27,2	27,1	28,0	9,0	7,5	1,4	
10	Intermediaær	21,5	41,6	25,2	7,7	3,3	0,8	
10	Fullplate	23,2	23,5	14,9	25,3	12,6	0,6	
11	Lavplate	30,1	25,7	16,5	11,9	8,4	7,4	
11	Intermediaær	28,3	23,4	26,1	6,1	5,4	10,6	
11	Fullplate	36,9	17,8	17,5	8,3	9,8	9,8	
12	Lavplate	15,4	20,2	33,1	16,5	8,2	6,7	
12	Intermediaær	24,5	17,1	23,0	9,9	13,8	11,7	
12	Fullplate	18,8	16,4	10,4	17,1	25,9	11,4	